

4  
日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

10/018251  
PCT/JP-GO/03863  
REC'D 04 AUG 2000  
WIPO  
14.06.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 6月14日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第167453号

出 願 人

Applicant (s):

藤森工業株式会社

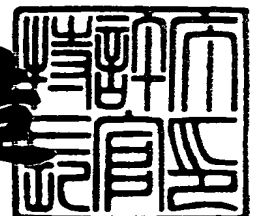
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3057350

【書類名】 特許願

【整理番号】 99P0180

【提出日】 平成11年 6月14日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 A61K 38/36  
A61M 1/36

【発明の名称】 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子、該因子に類似した物質、これらの製造方法、並びにこれらの用途

【請求項の数】 28

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋馬喰町 1 丁目 4 番 1 6 号 藤森工業株式会社 研究開発本部内

【氏名】 細川 和也

【特許出願人】

【識別番号】 000224101

【氏名又は名称】 藤森工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100072349

【弁理士】

【氏名又は名称】 八田 幹雄

【電話番号】 03-3230-4766

【選任した代理人】

【識別番号】 100102912

【弁理士】

【氏名又は名称】 野上 敦

【選任した代理人】

【識別番号】 100110995

【弁理士】

【氏名又は名称】 奈良 泰男

【選任した代理人】

【識別番号】 100111464

【弁理士】

【氏名又は名称】 齋藤 悦子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001719

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子、該因子に類似した物質、これらの製造方法、並びにこれらの用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子。

【請求項2】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第X因子であることを特徴とする請求項1に記載の因子。

【請求項3】 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子に類似した物質。

【請求項4】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第X因子の少なくとも1つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第X因子の変異体であることを特徴とする請求項3に記載の物質。

【請求項5】 1. 活性化血液凝固第X因子の活性セリン残基部位と合成阻害剤とを反応させる工程、

2. pH 11以上でアルカリ処理を行う工程、

3. 回収操作を行う工程、

を含み、かつ前記各工程を順次行う合成方法であって、

少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質を共存させることを特徴とする基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子の合成方法。

【請求項6】 前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物が、グリセリン、エチレングリコールおよびショ糖よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物であることを特徴とする請求項

5に記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子の合成方法。

【請求項7】 前記塩もしくは両性電解質が、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよびグリシンよりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物であることを特徴とする請求項5または6に記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子の合成方法。

【請求項8】 前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物は、気温23℃、相対湿度50%の環境下において、液体である場合は体積比で、粉体、粒体または固体である場合は重量比で、全体に対する割合が5%以上であることを特徴とする請求項5～7のいずれか1項に記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子の合成方法。

【請求項9】 前記塩もしくは両性電解質の濃度が、0.2M以上であることを特徴とする請求項5～8のいずれか1つに記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子の合成方法。

【請求項10】 遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第X因子の求核性（活性）を付与しているアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加してなるアミノ酸配列からなる物質を形成することを特徴とする基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子に類似した物質の合成方法。

【請求項11】 リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子または活性化血液凝固第X因子に類似した物質を有する親和性吸着体。

【請求項12】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第X因子の少なくとも1つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第X因子の変

異体であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の親和性吸着体。

【請求項 1 3】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第 X 因子であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の親和性吸着体。

【請求項 1 4】 活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤の精製または除去に用いる、請求項 1 1 に記載の親和性吸着体。

【請求項 1 5】 前記活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤が、血液凝固第 VIII 因子であることを特徴とする請求項 1 4 に記載の親和性吸着体。

【請求項 1 6】 リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子または活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質を有する親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィー。

【請求項 1 7】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第 X 因子の少なくとも 1 つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第 X 因子の変異体であることを特徴とする請求項 1 6 に記載のアフィニティークロマトグラフィー。

【請求項 1 8】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第 X 因子であることを特徴とする請求項 1 6 に記載のアフィニティークロマトグラフィー。

【請求項 1 9】 活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤の精製または除去に用いる、請求項 1 6 に記載のアフィニティークロマトグラフィー。

【請求項 2 0】 前記活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤が、血液凝固第 VIII 因子であることを特徴とする請求項 1 9 に記載のアフィニティークロマトグラフィー。

【請求項 2 1】 リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子または活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質を有する親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーの工程を有することを特徴とする活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤の精製方法。

【請求項 2 2】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第 X 因子の少なくとも 1 つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第 X 因子の変異体であることを特徴とする請求項 2 1 に記載の精製方法。

【請求項 2 3】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第 X 因子であることを特徴とする請求項 2 1 に記載の精製方法。

【請求項 2 4】 前記活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤が、血液凝固第 VIII 因子であることを特徴とする請求項 2 1 に記載の精製方法。

【請求項 2 5】 リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子または活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質を有する親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーの工程を有することを特徴とする、夾雑物として含有されている活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤の除去方法。

【請求項 2 6】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第 X 因子の少なくとも 1 つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第 X 因子の変異体であることを特徴とする請求項 2 5 に記載の除去方法。

【請求項 2 7】 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第 X 因子であることを特徴とする請求項 2 5 に記載の除去方法。

【請求項 2 8】 前記活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤が

、血液凝固第VIII因子であることを特徴とする請求項 2 5 に記載の除去方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子、これに類似した物質、およびこれらの合成方法、並びにこれらの用途に関するものである。より詳しくは新規な基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子およびこれに類似した物質と、その新規物質の製造方法、並びにこの新規物質の用途として、該新規物質をリガンドとして有する親和性吸着体、当該親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィー、さらに、当該アフィニティークロマトグラフィーの工程を有することを特徴とする新規な活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤の精製方法に関するものである。より詳しくは、アフィニティークロマトグラフィーのリガンドとしてアンヒドロ活性化血液凝固第X因子のような基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子または活性化血液凝固第X因子に類似した物質を用いて、活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤を精製する方法に関するものである。さらに、本発明は、上記アフィニティークロマトグラフィーの特異的な吸脱着作用を利用して、他の精製対象物中に夾雑物として含まれている活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤を除去する方法に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来技術】

現在までに、活性化血液凝固第X因子のアンヒドロ体（本明細書では、アンヒドロ活性化血液凝固第X因子または単にアンヒドロFXaともいう）のような基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子および該因子に類似した物質に関して学術論文や特許公報などの文献等において何ら記載されておらず、またこうした文献等におけるかかる物質に関する示唆も一切なされておらず、全く新規な物質である。



【0003】

一方、血液凝固第VIII因子（本明細書では、単にFVIIIともいう）は、血液凝固機構において、凝血が始まりトロンビンが形成される前までの凝血第一相の内因性機序に関与するものである。このFVIII活性が低下している疾患を血友病Aとよぶことから、該FVIIIは、抗血友病グロブリンまたは抗血友病因子Aと呼ばれている。

【0004】

血友病Aは、性染色体劣性遺伝であり、因子活性低下の程度により、軽症、中等症、重症に分類され、軽症では、自然出血はまれであり、外傷や手術、抜歯時の止血困難によって初めて気づく程度であるが、中等症ないし重症例では、自然出血が主症状となり、内因性凝固障害のため出血が深部組織に起こり、特に関節腔内への出血はこの疾患に特徴的で、反復出血により関節症をきたし、さらに関節は拘縮変形して機能障害を呈するようになるほか、筋肉内出血、頭蓋内出血、腎出血等が認められる。

【0005】

こうした血友病の患者治療には、遺伝子治療あるいは移植治療も考えられるが現時点では臨床的研究が進められている段階であり、血友病患者に対して実用化はされておらず、現状では、出血時に欠損因子であるFVIIIを補充し、その都度、止血を図るか、もしくは出血が予想されるときに予備的に補充する治療が必要となっている。

【0006】

こうした血友病の患者治療に用いられるFVIII製剤（欠乏しているFVIIIの血中レベルを止血水準まで高め、出血を防止するもの）としては、ヒト血漿中のFVIIIの濃度が0.1～0.2mg/lと極めて少ないため、Chon I分画を凍結したものを低温で徐々に融解した際に生ずる沈澱であるクリオプレシピテート（FVIIIが高濃度に存在する）を製剤として用いていたが、輸血後に肝炎（B型肝炎、C型肝炎）やAIDS（後天性免疫不全症候群）に感染する危険性があるため、現在では、60℃で10時間液状加熱した乾燥濃縮人FVIII製剤や、65℃で95時間乾燥加熱処理した乾燥濃縮人FVIII製剤等の安全性の極めて高い加熱

製剤が使用されているほかに、献血者血漿を原料に、加熱処理や有機溶媒／界面活性剤処理（TNBP／オクトキシノール9処理）にてウイルス不活化し、抗FV IIIモノクローナル抗体を使用して精製分離した乾燥濃縮人FVIII製剤や、例えば、特開平7-278197号（特許番号2513993号）等に関示されているように、遺伝子組み換え技術により産生された産物を第VIII：C因子活性のC-末端サブユニットに対するモノクローナル抗体を使ったアフィニティークロマトグラフィー等により精製されたりコンビナント製剤がある。

【0007】

しかしながら、加熱処理や有機溶媒／界面活性剤処理にてウイルス不活化が図られ安全性が高められた製剤も、非A非B型肝炎等のウイルス感染症の危険性を完全に否定できず、また加熱製剤ではフィブリノーゲンが含まれているので、投与により血中のフィブリノーゲン濃度が過度に上昇するおそれがある。一方、上記モノクローナル抗体を使用して精製分離する場合には、（1）モノクローナル抗体に異種動物蛋白が使われていることが多いことから、製剤中に異種動物蛋白混入の危険性があり、（2）コスト面でも該モノクローナル抗体自体が極めて高価であるため、最終的に得られる製剤も高価なものにならざるを得ないとする問題がある。

【0008】

従って、こうした問題なくFVIIIを精製することのできる技術が強く求められている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、新規な基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子、該因子に類似した物質、並びにこれらの合成方法を提供するものである。

【0010】

また、本発明の他の目的は、新規な基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子、該因子に類似した物質の有用な用途を提供するものである。

【 0 0 1 1 】

即ち、本発明の他の目的は、リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子または活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質を有する親和性吸着体および当該親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーを提供するものである。

【 0 0 1 2 】

また、本発明の他の目的は、新規かつ安価な分離精製手段を利用し、簡単な分離精製操作および短い精製分離工数により、安価で高純度の活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤を効率よく安全かつ安定的に精製する方法を提供するものである。

【 0 0 1 3 】

また、本発明の他の目的は、異種動物蛋白等の不純物の混入の危険性がなく、かつ安価に FVIII を精製する方法を提供するものである。

【 0 0 1 4 】

また、本発明の他の目的は、肝炎（B 型肝炎、C 型肝炎）、A I D S（後天性免疫不全症候群）などのウイルス感染を伴うことなく、投与によっても血中のフィブリノーゲン濃度が過度に上昇するおそれのない FVIII を精製する方法を提供するものである。

【 0 0 1 5 】

また、本発明の他の目的は、血漿中に少量しか含まれていない FVIII を従来の精製方法に比べ高純度、高回収率に精製する方法を提供するものである。

【 0 0 1 6 】

また、本発明の他の方法は、血漿以外の血小板や胎盤などの天然由来の FVIII により得られた FVIII を従来の精製方法に比べ高純度、高回収率に精製し、さらに従来の精製方法で問題となっていた免疫原となるような不純物の含まれる可能性がほとんどなく、ウイルスの混入される確率が著しく減る精製方法を提供するものである。

【 0 0 1 7 】

また、本発明の他の方法は、遺伝子組み換え操作により得られたFVIIIおよびその変異体（FVIIIのアミノ酸配列の少なくとも一のアミノ酸が遺伝子組換え操作により欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつFVIII活性を有する変異体）に対しても蛋白質等の不純物の分離精製を天然由来のFVIIIの精製方法を利用して行っている当該精製方法に比べ高純度、高回収率に精製する方法を提供するものである。

## 【0018】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者は、新規な基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子、該因子に類似した物質、並びにこれらの合成方法を見出し、本発明を完成するに至ったものである。さらに、本発明者らは、上記新規物質の利用に関して鋭意検討した結果、活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤と特異的かつ可逆的に反応するリガンドとして基質ないし阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子、例えば、アンヒドロ活性化血液凝固第X因子等を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーを活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤の精製工程（精製最終工程後に組み込む場合を含む）に組み入れることにより、該アンヒドロ活性化血液凝固第X因子等はヒト活性化血液凝固第X因子から調製されたヒト由来蛋白であり、かつ抗FVIII抗体等に比して極めて安価であるので、該アンヒドロ活性化血液凝固第X因子等による分離により従来の上記に示すような問題点は解決されることを見出し、本発明を完成するに至ったものである。また、本発明者らは、該アンヒドロ活性化血液凝固第X因子等により活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤を特異的に分離できる作用に基づき、他の精製対象物中に夾雑物として含まれている活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤（除去する対象物は、2種以上であってもよい）の除去にも適用できる事を見出し、本発明を完成するに至ったものである。

## 【0019】

すなわち、本発明の目的は、下記（1）～（28）により達成されるものであ

る。

【 0 0 2 0 】

(1) 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子。

【 0 0 2 1 】

(2) 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第 X 因子であることを特徴とする上記（1）に記載の因子。

【 0 0 2 2 】

(3) 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質。

【 0 0 2 3 】

(4) 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第 X 因子の少なくとも 1 つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第 X 因子の変異体であることを特徴とする上記（3）に記載の物質。

【 0 0 2 4 】

(5) 1. 活性化血液凝固第 X 因子の活性セリン残基部位と合成阻害剤とを反応させる工程、

2. pH 11 以上でアルカリ処理を行う工程、

3. 回収操作を行う工程、

を含み、かつ前記各工程を順次行う合成方法であって、

少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物と塩もしくは両性電解質を共存させることを特徴とする基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子の合成方法。

【 0 0 2 5 】

(6) 前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくと

も 1 種の化合物が、グリセリン、エチレングリコールおよびショ糖よりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物であることを特徴とする上記 (5) に記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた活性化血液凝固第 X 因子の合成方法。

【0 0 2 6】

(7) 前記塩もしくは両性電解質が、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよびグリシンよりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物であることを特徴とする上記 (5) または (6) に記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた活性化血液凝固第 X 因子の合成方法。

【0 0 2 7】

(8) 前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物は、気温 2 3℃、相対湿度 5 0 % の環境下において、液体である場合は体積比で、粉体、粒体または固体である場合は重量比で、全体に対する割合が 5 % 以上であることを特徴とする上記 (5) ～ (7) のいずれか 1 つに記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた活性化血液凝固第 X 因子の合成方法。

【0 0 2 8】

(9) 前記塩もしくは両性電解質の濃度が、0. 2 M 以上であることを特徴とする上記 (5) ～ (8) のいずれか 1 つに記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた活性化血液凝固第 X 因子の合成方法。

【0 0 2 9】

(1 0) 遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第 X 因子の求核性 (活性) を付与しているアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加してなるアミノ酸配列からなる物質を形成することを特徴とする基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質の合成方法。

【0 0 3 0】

(1 1) リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子または活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質を有する親和性吸着体。

【0 0 3 1】

(1 2) 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第 X 因子の少なくとも 1 つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第 X 因子の変異体であることを特徴とする上記 (1 1) に記載の親和性吸着体。

【0 0 3 2】

(1 3) 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第 X 因子であることを特徴とする上記 (1 1) に記載の親和性吸着体。

【0 0 3 3】

(1 4) 活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤の精製または除去に用いる、上記 (1 1) に記載の親和性吸着体。

【0 0 3 4】

(1 5) 前記活性化血液凝固第 X 因子基質および／または阻害剤が、F V I I であることを特徴とする上記 (1 4) に記載の親和性吸着体。

【0 0 3 5】

(1 6) リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子または活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質を有する親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィー。

【0 0 3 6】

(1 7) 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第 X 因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第 X 因子の少なくとも 1 つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第 X 因子の変異体であ

ることを特徴とする上記（16）に記載のアフィニティークロマトグラフィー。

【0037】

（17） 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第X因子であることを特徴とする上記（16）に記載のアフィニティークロマトグラフィー。

【0038】

（19） 活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤の精製または除去に用いる、上記（16）に記載のアフィニティークロマトグラフィー。

【0039】

（20） 前記活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤が、FVII Iであることを特徴とする上記（19）に記載のアフィニティークロマトグラフィー。

【0040】

（21） リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子または活性化血液凝固第X因子に類似した物質を有する親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーの工程を有することを特徴とする活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤の精製方法。

【0041】

（22） 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第X因子の少なくとも1つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第X因子の変異体であることを特徴とする上記（21）に記載の精製方法。

【0042】

（23） 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第X因子であることを特徴とする上記（21）に記載の精製方法。



【0043】

(24) 前記活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤が、FVII Iであることを特徴とする上記(21)に記載の精製方法。

【0044】

(25) リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性(活性)を失わせた活性化血液凝固第X因子または活性化血液凝固第X因子に類似した物質を有する親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーの工程を有することを特徴とする、夾雑物として含有されている活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤の除去方法。

【0045】

(26) 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性(活性)を失わせた活性化血液凝固第X因子に類似した物質が、遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第X因子の少なくとも1つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる活性化血液凝固第X因子の変異体であることを特徴とする上記(25)に記載の除去方法。

【0046】

(27) 前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性(活性)を失わせた活性化血液凝固第X因子が、アンヒドロ活性化血液凝固第X因子であることを特徴とする上記(25)に記載の除去方法。

【0047】

(28) 前記活性化血液凝固第X因子基質および／または阻害剤が、FVII Iであることを特徴とする上記(25)に記載の除去方法。

【0048】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0049】

本発明は、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性(活性)を失わせた活性化血液凝固第X因子およびこれに類似した物質である。

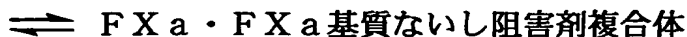
## 【0050】

ここで、基質および／または阻害剤とは、活性化血液凝固第X因子（本明細書では、単にFXaともいう）に対しそれぞれ基質および／または阻害剤として作用するものをいい、具体的には、血液凝固第VIII因子（本明細書では、単にFVIIIともいう）などが挙げられる。このFXa基質および／または阻害剤は、ミカエリス－メンテン(Michaelis-Menten)の説（酵素反応は、酵素分子と基質分子が結合し、酵素基質複合体を生じてから化学反応が進行し、この複合体から反応生産物が遊離して酵素は反応初期時の状態に戻るとする説）により①のような反応形態をとる。

## 【0051】

## 【化1】

## ① FXa + FXa基質ないし阻害剤



## 【0052】

FXaの求核性（活性）は、FXa中の活性セリン付近のアミノ酸の電荷リレー系(charge relay system: キモトリプシンおよび他のセリンプロテアーゼの活性部位に存在しているアミノ酸の側鎖間の一連の水素結合をいい、活性部位におけるセリン残基の水酸基の高度な求核性（活性）の原因となっている。すなわち、その一連の水素結合は、アスパラギン酸の負に荷電したカルボキシル基からセリン残基の水酸基の酸素へ電子を流し、その結果、水酸基の酸素を高度に求核的にするものである。）が関与していると言われている。

## 【0053】

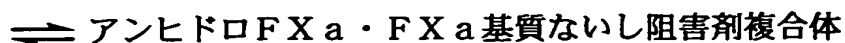
本発明者は、この電荷リレー系を、アンヒドロ化や遺伝子操作によって破壊することによりFXa基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を著しく低下させることができることを見出した。例えば、FXa活性部位中のアスパラギン酸をアスパラギンに置換等するか、またはFXa中の活性セリンをアラニンに置換等することにより、FXa基質および／また

は阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに F X a の活性（求核性）を著しく低下させることができる。これにより、F X a 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a およびこれに類似した物質は、F V I I I などの F X a 基質および／または阻害剤、その他蛋白と可逆的な以下の②のような反応（ここでは、F X a 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a または F X a に類似した物質として、アンヒドロ F X a （F X a をアンヒドロ化してなるアンヒドロ体）を用いた例を示す。）をすることを見出し、本発明の新規物質の合成に成功したものである。すなわち、F X a を合成阻害剤と反応させて F X a の活性セリン残基とエステル結合を形成せしめることで、アンヒドロ F X a などの F X a 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに F X a の求核性（F X a 活性）を失わせた F X a およびこれに類似した物質を合成する事ができ、さらに該新規物質においては、セファロース等の担体（支持体）に結合する能力が残っており、F X a 基質および／または阻害剤に対する特異的な結合能力により優れた結合性を有することをも見出したものである。この特殊な能力は、新規物質の有用性の 1 つであり、用途的に親和性吸着体のリガンドとして大いに利用できることがわかったのである。このアンヒドロ F X a などの F X a 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a およびこれに類似した物質は、酵素を素材にしているにもかかわらず、その特異的結合能力だけを利用する新しい概念のリガンドとなり得るものであるといえる。

【0 0 5 4】

【化 2】

## ② アンヒドロ F X a + F X a 基質ないし阻害剤



【0 0 5 5】

本発明の新規物質である、F X a 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a およびこれに類似した物質

としては、(1) F X a (天然由来のものであっても、遺伝子組換操作により合成されたものであってもよい) をアンヒドロ化してなるアンヒドロ体 (本明細書では、単にアンヒドロ活性化血液凝固第 X 因子またはアンヒドロ F X a ともいう) 、(2) F X a のアミノ酸配列の少なくとも一のアミノ酸を遺伝子組換操作等により欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつ基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた F X a の変異体、(3) F X a の求核性 (活性) を電荷リレー系により付与していると考えられるアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加することにより、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた F X a の変異体が挙げられるが、これら以外にも、上記に説明した本発明の新規物質に関する基本的な概念 (技術的思想の範囲) に基づいて新たに合成される物質は、本発明の技術範囲に含まれるものであることは言うまでもない。例えば、F X a 活性部位中のアスパラギン酸からアスパラギンへの置換、または F X a 活性部位中の活性セリンからアラニンへの置換により、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた F X a およびこれに類似した物質などは、本発明の技術範囲に含まれるものであり、本発明の新規物質の 1 種である。

#### 【0056】

次に、本発明の新規物質である、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた F X a および該因子に類似した物質は、以下の方法で合成できる。

#### 【0057】

本発明の合成方法は、(1) 1. F X a の活性セリン残基部位と合成阻害剤とを反応させる工程、

2. p H 1 1 以上でアルカリ処理を行う工程、

3. 回収操作を行う工程、

を含み、かつ前記各工程を順次行う基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性 (活性) を失わせた F X a の合成方法であって、

少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる

群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物と塩もしくは両性電解質を共存させることを特徴とするものである。

【0 0 5 8】

また、(2) 上記(1)に記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性(活性)を失わせた F X a の合成方法において、前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物が、グリセリン、エチレングリコールおよびショ糖よりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物であることを特徴とするものである。

【0 0 5 9】

さらに、(3) 上記(1)または(2)に記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性(活性)を失わせた F X a の合成方法において、前記塩もしくは両性電解質が、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよびグリシンよりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物であることを特徴とするものである。

【0 0 6 0】

さらにまた、(4) 上記(1)～(3)のいずれか 1 つに記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性(活性)を失わせた F X a の合成方法において、前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物は、気温 2 3℃、相対湿度 5 0 % の環境下において、液体である場合は体積比で、粉体、粒体または固体である場合は重量比で、全体に対する割合が 5 % 以上であることを特徴とするものである。

【0 0 6 1】

また、(5) 上記(1)～(4)のいずれか 1 つに記載の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性(活性)を失わせた F X a の合成方法において、前記塩もしくは両性電解質の濃度が、0. 2 M 以上であることを特徴とするものである。

【0 0 6 2】

上記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性(活性)を失わせた F X a の合成方法は、

1. FXaの活性セリン残基部位と合成阻害剤とを反応させる工程（第1工程）、

2. pH 11以上でアルカリ処理を行う工程（第2工程）、

3. 回収操作を行う工程（第3工程）、

を含み、かつ前記各工程を順次行う基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaの合成方法であって、

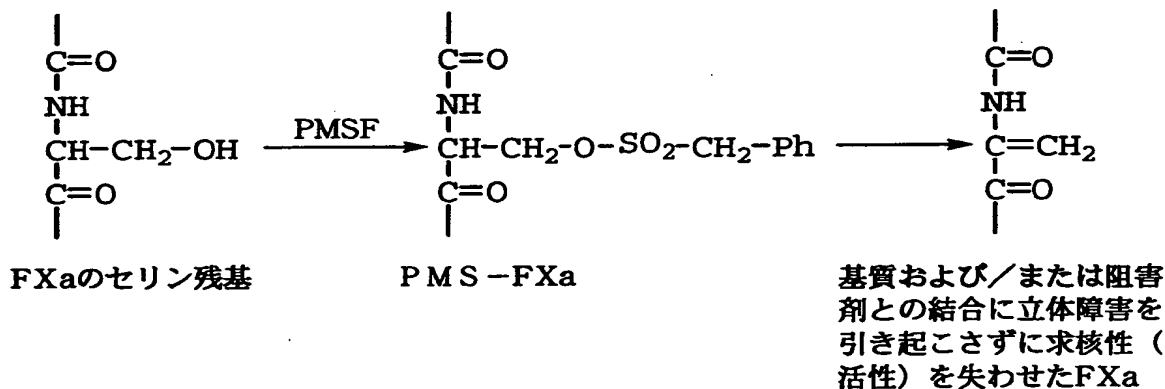
少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質を共存させることを特徴とするものである。

【0063】

具体的に合成阻害剤としてフェニルメタンスルホニルフルオリド（以下、PMSFともいう）の場合を例にとれば、下記反応式として表すことができる。

【0064】

【化3】



【0065】

以下、上記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaの合成方法を上記1～3の工程に従って説明する。

【0066】

（1）第1工程

第1工程では、FXaを合成阻害剤と反応させてFXaの活性セリン残基とエステル結合を形成せしめてFXa活性を失わせる目的で、FXaの活性セリン残

基部位を合成阻害剤と反応させるものである。

【 0 0 6 7 】

ここで、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a の合成に用いることのできる F X a としては、特に制限されるものでなく、既に市販されている各種の精製 F X a などをもそのまま用いることができる。

【 0 0 6 8 】

また、上記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a の合成に用いることのできる合成阻害剤としては、上記反応式に例示したように、F X a の活性セリン残基と反応してエステル結合を形成することのできるものであれば、特に制限されるものではなく、例えば、P M S F、2-フェニルエタン-1-スルホニルフルオリド、メタンスルホニルフルオリド、p-トルエンスルホニル（トシル）フルオリドなどの各種のスルホニルフルオリド、トシルクロリド、ジイソプロピルフルオロリン酸（以下、D F Pともいう）、3, 4-ジクロロイソクマリン（以下、3, 4-D C Iともいう）、L-1-クロロ-3-[4-トシルアシド]-7-アミノ-2-ヘプタノン-塩酸（以下、T L C Kともいう）、L-1-クロロ-3-[4-トシルアシド]-4-フェニル-2-ブタノン（以下、T P C Kともいう）などが挙げられる。

【 0 0 6 9 】

これら合成阻害剤を添加する際には、該阻害剤をあらかじめメタノール、アセトン、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、プロパン-2-オール、アセトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどの溶媒に溶解したものをを用いてもよい。また、合成阻害剤を添加する際には、過剰な添加によるその後の分離除去操作の煩わしさを低減し、また反応性を高めるため、F X a 活性を3%以下、より好ましくは1%以下になるまで、確認しながら行うことが望ましい。

【 0 0 7 0 】

さらに、反応溶媒としては、F X a の生存に良好なように、浸透圧やイオンの

平衡を調節する目的で  $\text{NaCl}$  が調合された塩類溶液、あるいはさらに  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  などのイオンを数種加えた組成のものが調合された塩類溶液であって、さらに  $\text{pH}$  を安定に維持するように緩衝系として  $\text{pH} 2 \sim 10$ 、好ましくは  $\text{pH} 4 \sim 8$  を示す緩衝液から任意に選ばれたものを加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸－リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸－水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウム－水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール－塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げることができる。

## 【0071】

また、反応条件としては、一般に熱的变化が  $\text{FXa}$  の安定化に大きく影響することから、反応温度は  $-30 \sim 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは  $4 \sim 40^\circ\text{C}$  の範囲で行うことが望ましい。

## 【0072】

上記反応により得られた生成物は、従来公知の方法を用いて精製分離を行う。

## 【0073】

精製分離に用いられる方法としては、特に制限されるものでなく、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、限外濾過膜、透析などが挙げられる。代表的なゲル濾過について説明すれば、反応後の溶液を、溶媒で膨潤させたゲル（例えば、セファデックス、バイオゲル、アガロースゲルなど）粒子のカラムに添加し溶媒を流し続けることで、まず高分子溶質の  $\text{FXa}$  生成物、遅れて低分子溶質の合成阻害剤などが溶出し両者が分離されるものである。ここで使用することのできる溶媒としては、 $\text{FXa}$  の生存に良好なように、浸透圧やイオンの平衡を調節する目的で  $\text{NaCl}$  が調合された塩類溶液、あるいはさらに  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  などのイオンを数種加えた組成のものが調合された塩類溶液であって、さらに  $\text{pH}$  を安定に維持するように緩衝系として  $\text{pH} 2 \sim 10$ 、好ましくは  $\text{pH} 4 \sim 8$  を示す緩衝液を加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸－リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸－水酸化



ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウム-水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール-塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げることができる。

【0074】

## (2) 第2工程および第3工程

第2、第3工程では、エステル結合を解離させると共にセリン残基をアラニン残基に交換して基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaを合成し、さらに高pH領域から中性付近にpHを戻して再生する間に、凝集・会合を起こさずに簡便な操作によって該基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaを高収率で得る目的で、第1工程で精製分離されたFXa生成物に対し、pH11以上でのアルカリ処理を行う工程（第2工程）と、回収操作を行う工程（第3工程）を順次行うものであって、少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質を共存させることを特徴とするものである。

【0075】

まず、第1工程で精製分離されたFXa生成物を溶解させる溶媒としては、FXaの生存に良好なように、浸透圧やイオンの平衡を調節する目的でNaClが調合された塩類溶液、あるいはさらに $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ などのイオンを数種加えた組成のものが調合された塩類溶液であって、さらにpHを安定に維持するように緩衝系としてpH2～10、好ましくはpH4～8を示す緩衝液から任意に選ばれたものを加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸-水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウム-水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール-塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げることができる。

【0076】

また、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaの合成に使用される多価アルコールおよび糖類よりな

る群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物は、塩もしくは両性電解質との併用により高pH領域でのアルカリ処理において、蛋白の凝集・会合を起こさずアンヒドロ化を促進し、回収操作において、高pH領域から中性付近にpHをもどす際に、凝集・会合を起こさずアンヒドロFxaを再生する目的で添加するものである。ただし、回収操作にのみ用いても上記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFxaの合成の目的を達成し得るものである。

# 【0077】

上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物としては、例えば、テトリトール（具体的には、エリトリトール、D-スレイトール、L-スレイトール、D, L-スレイトール）、ペンチトール（具体的には、リビトール、D-アラビニトール、L-アラビニトール、D, L-アラビニトール、キシリトール）、ヘキシトール（具体的には、アリトール、ダルシトール（ガラクトール）、ソルビトール（D-グルシトール）、L-グルシトール、D, L-グルシトール、D-マンニトール、L-マンニトール、D, L-マンニトール、D-アルトリトール、L-アルトリトール、D, L-アルトリトール、D-イジトール、L-イジトール）、ヘプチトール、マルチトール、ラクチトール、グリセリン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール、ネオペンチルグリコール、ペンタメチレングリコール、ヘキサメチレングリコール、ペンタエリトリトール、ジペンタエリトリトール、トリペンタエリトリトール、トリメチロールエタン、トリメチロールプロパン、無水エンネアヘプチトール、1, 4-ブタンジオール、1, 2, 4-ブタントリオールおよび1, 2, 6-ヘキサントリオールなどの多価アルコール（糖アルコールを含む）、グリセリンアルデヒドジオキシアセトン、トレオース、エリトルロース、エリトロース、アラビノース、リブロース、リボース、キシロース、キシルロース、リキソース、グルコース、フルクトース、マンノース、イドース、ソルボース、グロース、タロース、タガトース、ガラクトース、アロース、プシコース、アルトロースおよびショ糖などの糖類などが挙げられる。これらは1種単独

若しくは2種以上を混合して用いることができる。なかでも、グリセリン、エチレングリコールおよびショ糖よりなる群より選ばれてなる少なくとも1種の化合物が好ましい。

## 【0078】

また、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物は、気温23℃、相対湿度50%の環境下において、液体である場合は体積比で、粉体、粒体または固体である場合は重量比で、全体に対する割合が5%以上、好ましくは15%以上であることが望ましい。ただし、全体に対する割合が5%未満であっても、併用する塩もしくは両性電解質の濃度を相対的に高めることにより、第2～第3工程を行うことは可能であり、所望の効果を有効に発現できる。よって、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の全体に対する割合（濃度）は、その種類に応じて、所望の効果を有効に発現できるように適当な濃度を適宜決定することが望ましく、かかる決定に際しては併用する塩もしくは両性電解質の種類や濃度を考慮する必要がある。

## 【0079】

上記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaの合成に使用される塩もしくは両性電解質は、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物との併用により高pH領域でのアルカリ処理において、蛋白の凝集・会合を起こさずアンヒドロ化を促進し、回収操作において、高pH領域から中性付近にpHを戻す際に、凝集・会合を起こさず基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaを再生する目的で添加されるものであって、かかる目的を得るに適した塩濃度（イオン強度）、誘電率が得られるならば特に制限されるものではなく、有機、無機は限定されるものではない。

## 【0080】

よって、上記塩もしくは両性電解質としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等のハロゲン化アルカリ金属、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等のハロゲン化アルカリ土類金属、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸ナト

リウム、炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カルシウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素アンモニウム、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二アンモニウム、ホウ酸ナトリウム、ホウ酸カリウムなどの無機酸塩、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、クエン酸マグネシウム、クエン酸カルシウム、クエン酸アンモニウム、フタル酸ナトリウム、フタル酸カリウム、フタル酸マグネシウム、フタル酸カルシウム、フタル酸アンモニウム、コハク酸ナトリウム、コハク酸カリウム、コハク酸マグネシウム、コハク酸カルシウム、コハク酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸カルシウム、酢酸マグネシウム、酢酸アンモニウム等の有機酸塩、グリシン、アラニン等の両性電解質となるアミノ酸などの水に可溶な塩もしくは両性電解質が挙げられる。これらは1種単独若しくは2種以上を混合して用いることができる。なかでも、水に易溶で、併存する上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の濃度に応じて最適なイオン強度（塩濃度）、誘電率に容易に調整でき、さらに精製分離工程（例えば透析など）が容易（ないし簡略化できるもの）である低分子のアルカリ金属塩や無機塩類、両性電解質などが望ましく、具体的には、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよびグリシンよりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物が望ましいといえる。

#### 【0081】

また、上記塩もしくは両性電解質の濃度は、0.2 M以上、好ましくは0.5 M以上とすることが望ましい。ただし、当該濃度が0.2 M未満であっても、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の場合と同様に当該化合物の全体に対する割合を相対的に高めることにより、第2～第3工程を行うことは可能であり、所望の効果を有効に発現できる。

#### 【0082】

第2工程において、アルカリで処理してアンヒドロ化する（すなわち、第1工程で精製分離されたFXa生成物に対してエステル結合を解離させると共にセリン残基をアラニン残基に交換して基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaを合成する）には、反応系の

pHが11以上となるように、アルカリを添加して調整し（さらに、必要に応じて、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質の共存下で）、反応温度 $-30\sim 50^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $4\sim 40^{\circ}\text{C}$ の範囲を保持する。上記pHが11未満の場合には、脱PMSE反応が起こらずアンヒドロ化が進行せず好ましくない。上記アルカリとしては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの1価の塩基、水酸化カルシウム、水酸化バリウム、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムなどの2価の塩基、水酸化鉄などの3価の塩基などを挙げるができる。上記反応温度が $-30^{\circ}\text{C}$ 未満の場合には、反応系が凍結する可能性があり好ましくなく、一方、 $50^{\circ}\text{C}$ を超える場合には、FXaが蛋白変性を受け、その後の再生操作によっても元の状態に戻らなくなるなど好ましくない。

## 【0083】

次に、第3工程において、上記アルカリ処理により合成された基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaを含む溶液は、その後（アンヒドロ化反応後）、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質の共存下で再生操作により元の状態（立体構造状態）に戻される。該再生操作としては、特に制限されるものでなく、従来公知の方法を利用することができ、例えば、反応後の系（溶液）のpHを $4\sim 10$ の範囲に溶媒（上記アンヒドロ化反応で用いたと同種の溶媒などが使用できる）にて調整し、 $-30\sim 50^{\circ}\text{C}$ の温度範囲で一定時間保持する方法、透析によりpHを $4\sim 10$ の範囲に調整する方法などをとることができる。

## 【0084】

次に、再生された基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXaは、共存させた多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物、さらに除去する必要がある塩あるいは両性電解質（NaClやリン酸塩類等の塩あるいは両性電解質の1種が、最終的なアンヒドロFXaの抽出操作に用いる溶出液に含まれていてもよいような場合には、あえて分離除去する必要のないこともある）を除去すること

を目的とした精製分離を行う。かかる精製分離方法としては、特に制限されるものでなく、従来公知の方法を利用することができ、例えば、透析、限外濾過、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどを利用することができる。代表的な透析操作では、再生した基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a 溶液から多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物をセルロースなどの膜を介して pH 4 ~ 10 の溶媒（上記アンヒドロ化反応や再生操作に用いたと同種の溶媒などが使用できる）に透過させる。

#### 【0085】

次いで、不純物を除去することを目的として精製分離を行い、所望の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a を得る。かかる精製分離方法としては、特に制限されるものでなく、従来公知の精製分離方法を利用することができ、例えば、図 1 に概略したように、多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも 1 種の化合物を除いた基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a 溶液を、YM10 メンブランなどを用いて濃縮し、次に、pH 4 ~ 10 の溶媒（上記アンヒドロ化反応や再生操作に用いたと同種の溶媒などが使用できる）で平衡化したベンザミジンセファロースカラム等に通液して洗浄し、さらに pH 4 ~ 10 に調整されたベンザミジン溶液（当該溶液には、目的蛋白を特異的吸着させる目的で塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムなどの塩類が含まれていてもよい）で溶出し、ベンザミジンを除去する目的で pH 4 ~ 10 の溶媒（上記アンヒドロ化反応、再生操作に用いたと同種の溶媒などが使用できる）で透析して所望の基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a 溶液を抽出する方法、限外濾過による分離やセファデックスカラムによるゲル濾過等の方法などをとることができる。

#### 【0086】

基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性

）を失わせた F X a は、上記以外の合成方法、例えば、P M S に変えて反応工程中で塩酸グアニジン（G d n - H C l）を用いる方法や、上記合成方法において、F X a 活性部位中のアスパラギン酸をアスパラギンに置換する方法、F X a 活性部位中の活性セリンをアラニンに置換する方法などにより合成することができる。

#### 【0087】

また、本発明の新規物質の他の 1 種である、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a に類似した物質は、F X a の求核性（活性）を電荷リレー系により付与していると考えられるアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加することにより、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a の変異体として得ることができる。具体的には、遺伝子組換え操作により F X a の求核性（活性）を付与している少なくとも一のアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列からなる物質（言い換えれば、F X a のアミノ酸配列の少なくとも一のアミノ酸を遺伝子組換え操作により欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつ基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a の変異体）を形成する方法により得ることができる。

#### 【0088】

次に、上述した新規物質である基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a およびこれに類似した物質の用途発明（有用性）につき説明する。

#### 【0089】

本発明では、F X a 基質および／または阻害剤について今だ知られていない安価なヒト由来蛋白をリガンドに用いたアフィニティークロマトグラフィーによる特異的精製法を開発する上で、そのカギとなる F X a 基質および／または阻害剤との吸脱着が可能で安価なヒト由来蛋白によるリガンドを得るべく鋭意検討した結果、本発明者が初めて合成に成功した新規物質であるところの、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F

X a と、これに類似した物質のいずれもが有用であることを見出しなされたである。すなわち、本発明の新規物質は、上述したようにセファロース等の担体（支持体）に結合する能力が残っており、F X a 基質および／または阻害剤に対する特異的な結合能力により優れた結合性を有するため、リガンドとして利用することができるものであり、利用発明としては、①このリガンドを有する親和性吸着体、②この親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィー、③このアフィニティークロマトグラフィーの工程を有することを特徴とする F X a 基質および／または阻害剤の精製方法、さらに④このアフィニティークロマトグラフィーの工程を有することを特徴とする夾雑物として含有されている F X a 基質および／または阻害剤の除去方法がある。

## 【 0 0 9 0 】

まず、本発明の利用発明の 1 つは、リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a または F X a に類似した物質を有する親和性吸着体である。

## 【 0 0 9 1 】

基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a としては、アンヒドロ F X a が好ましい。また、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a に類似した物質である、F X a のアミノ酸配列の少なくとも一のアミノ酸が遺伝子組換え操作により欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a の変異体を利用してもよい。F X a と F X a 基質および／または阻害剤との結合部位は完全には明らかにされていないが、F X a のアニオンバインディングサイトと呼ばれる部位が重要と考えられる。よって、このバインディングサイトを保持したままに立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a ないしこれに類似した物質により F X a 基質および／または阻害剤の精製が可能である。従って、この様な F X a の変異体をリガンドとして本発明の親和性吸着体を使用することもできる。

## 【 0 0 9 2 】



ここに、このような F X a の変異体を使用する際には、F X a の求核性（活性）を電荷リレー系により付与していると考えられるアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加することにより、基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a の変異体が使用される。例えば、F X a 活性部位中のアスパラギン酸からアスパラギンへの置換、または F X a 活性部位中の活性セリンからアラニンへの置換により、基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a を得ることができる。

## 【 0 0 9 3 】

当該リガンド以外の親和性吸着体の構成要件及び親和性吸着体の製造方法（例えば、担体の選択及びその製法、スパーサの有無、リガンド固定化様式を選択、リガンドの固定化の方法（反応）、固定化リガンドの濃度など）に関しては、従来既知の技術を幅広く適用することができるものであり、これらの中から適宜選択して使用すればよい。

## 【 0 0 9 4 】

また、本発明の利用発明の他の 1 つは、リガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a およびこれに類似した物質を有する親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーを提供するものである。前記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a に類似した物質が、遺伝子組換え操作により F X a の少なくとも 1 つのアミノ酸を欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなる F X a の変異体であることが好ましい。また、基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a が、アンヒドロ F X a であることが好ましい。

## 【 0 0 9 5 】

さらに、本発明の用途発明の 1 つである、F X a 基質および／または阻害剤の精製方法は、リガンドとして基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a または F X a に類似した物質を有する親和性吸着体を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーの工程を有することを特徴とするものである。

## 【 0 0 9 6 】

リガンドとして上記アンヒドロ F X a 等の基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a および／またはこれに類似した物質を用い、該リガンドに F X a 基質および／または阻害剤のなかの所望の 1 つを特異的に吸着させ回収するには、一般的なアフィニティークロマトグラフィーの操作と同様の極めて簡単な操作によって行うことができる。すなわち、目的物質である F X a 基質および／または阻害剤のなかの所望の 1 つを含む溶液を適当な塩濃度で、かつ適当な p H 領域に調製し、例えば、上記リガンドを固定化した担体（＝吸着体）を用いたカラム等に流し、次に、適当な緩衝液等でカラムを洗浄した後、溶離液を流すと吸着されていた目的物質が鋭いピークとなって溶出回収されるものである。これにより、所期の効果を達成することができるものである。尚、目的物質である F X a 基質および／または阻害剤を含む溶液中には、目的物質以外の他の F X a 基質および／または阻害剤が含まれない状態若しくは目的物質に対してごく微量しか含まれない状態にしておく必要がある。これは、上述したようにこれらの目的物質以外の他の F X a 基質および／または阻害剤もリガンドであるアンヒドロ F X a 等の基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a および／またはこれに類似した物質と特異的に吸着することがあるためである。従って、遺伝子組み換え技術により産生した F X a 基質および／または阻害剤をその後に分離精製する場合には、特に問題はないが、ヒト由来の血漿からこうした目的物質を分離精製する場合にはこの点に十分に留意する必要がある。また、ヒト由来の血漿中では、F X a 基質および／または阻害剤の 1 種である F V I I I は、ビルブラント因子との複合体を形成しているため、ヒト由来の血漿中から F V I I I を分離精製する場合には、血漿中に塩化カルシウムを 0. 2 M 程度になるように添加調製することで、ビルブラント因子と F V I I I とを簡単に分離することができる。

## 【 0 0 9 7 】

また、初期精製段階として、複数のタンパク溶液からいくつかの F X a 基質および阻害剤を精製または除去することも可能である。

## 【 0 0 9 8 】

上記基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a としては、上述の通り、ヒト F X a をアンヒドロ化してなるアンヒドロ F X a が有用である。

【 0 0 9 9 】

本発明の精製方法の適用対象となり得る F X a 基質および／または阻害剤としては、血液凝固系に関与する因子を広く含むものであり、例えば、F V I I I などが挙げられる。

【 0 1 0 0 】

上記本発明の精製方法の適用対象となり得る F X a 基質および／または阻害剤は、血漿、血小板、胎盤などのヒト由来の F X a 基質および／または阻害剤、並びに遺伝子組換え操作により得られた F X a 基質および／または阻害剤（本発明においては、遺伝子組換え操作により、F X a 基質および／または阻害剤のアミノ酸配列の少なくとも一のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ血液凝固活性および抗 F X a 活性をそれぞれ維持するその変異体を含むものとする）が挙げられる。この際、遺伝子組み換え技術を用いて F X a 基質および／または阻害剤を調製する方法としては、特に制限されるものではなく、これらに関する従来既知の遺伝子組み換え技術を幅広く利用することができるものである。

【 0 1 0 1 】

本発明の精製方法では、上記基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a または F X a に類似した物質をリガンドに用いてなるアフィニティークロマトグラフィーの工程を F X a 基質および／または阻害剤の精製工程に組み入れるものであるが、該 F X a 基質および／または阻害剤の精製工程のいずれの段階に組み入れるかは、所期の目的を達成でき、さらに最も効果的で高収率を得ることができる段階がいずれであるのかを予備実験等を通じて求めるなど、従来既知の精製方法に応じて適宜決定すればよい。

【 0 1 0 2 】

さらに、本発明の利用発明の他の 1 つは、上記基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a をリガンドに用いてな

るアフィニティークロマトグラフィーの工程を、夾雑物として含有されている F X a 基質および／または阻害剤の除去工程に組み入れることを特徴とするものである。かかる発明は、上記精製分離工程の応用であって、該アフィニティークロマトグラフィーのリガンドであるアンヒドロ F X a 等により F X a 基質および／または阻害剤を特異的に吸脱着し得る特性に着目して、他の精製対象物中に、むしろ夾雑物として混入した F X a 基質および／または阻害剤（例えば、FVIII など）を該アフィニティークロマトグラフィーを用いて簡単に分離・除去できるものである。該アフィニティークロマトグラフィーのリガンドであるアンヒドロ F X a 等および F X a 基質および／または阻害剤に関する説明に関しては、上記精製方法で説明したと同様であり、ここでは省略する。

【0103】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0104】

実施例 1

ヒト血漿由来 F X a 10.5 mg を 5 mM リン酸緩衝液／0.1 M NaCl／pH 6.5 10 ml に溶解した液に 7% フェニルメチルスルフォニルフルオリド（PMSF）メタノール溶液 30  $\mu$ l を 30 分おきに総活性が 0.1% 未満になるまで添加した。

【0105】

この溶液を 0℃ に冷却し 1 M NaOH を 0.05 ml 添加し、12 分間反応させた。反応後 3 M NaCl 溶液を 5 ml 添加し、さらに 19 g のグリセリンを添加した。

【0106】

この溶液を 1 M トリス塩酸緩衝液 pH 7 を用い pH を 8 に調整し、4℃ で 12 時間放置し、その後 50 mM トリス塩酸緩衝液／1 M NaCl／pH 7.5 4℃ で 12 時間透析した。さらにその後 50 mM トリス塩酸緩衝液／0.1 M NaCl／pH 7.5 で 4℃ で 12 時間透析した。この溶液をその後 50 mM トリス塩酸緩衝液／0.1 M NaCl／pH 7.5 で 4℃ で平衡化したベンズア

ミジンセファロース 6 B カラムに添加し同緩衝液で完全に非吸着物を洗浄後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1 M ベンズアミジン / 0.1 M NaCl / pH 7.5 で溶出した。

【0107】

透析によりベンズアミジンを除去し、得られたアンヒドロ X a 約 5 mg を NH S-活性化カラムに固定化しアンヒドロ X a カラムを得た。

【0108】

このアンヒドロ X a カラムに以下に示す方法（特願平 11-104587 号に記載の方法）を用いて精製した FVIII 約 3000 単位を添加し、非吸着ピークを洗浄後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1 M ベンズアミジン / 0.1 M NaCl / pH 7.5 で溶出した結果、約 2800 単位回収され、比活性は 2600 単位 / mg であった。

【0109】

特願平 11-104587 号による FVIII の精製法

凍結クエン酸血漿 10 リットルを 4℃ で溶解して、クリオプレシピテートを得た。次に、このクリオプレシピテートを 4℃ で遠心分離（3000 × g、30 分）することによって血漿と分離し、1 リットルのクエン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解して、クリオ溶解液を得た。このクリオ溶解液に、90%（v/v）となるように乾燥 Sephacryl-300（ファルマシア社製）を加え、20℃ で 30 分間、攪拌した後、加圧濾過により上清を分離した。得られた上清約 200 ml について、上記同様の操作を再度繰り返して、約 40 ml のクリオ濃縮液（FVIII/vWF 複合体を含む濃縮液）を得た。これにより、一回の操作でおおよそ 5 倍の濃縮が可能であった。

【0110】

さらに、このクリオ濃縮液を Shepharose 6B（ファルマシア社製）カラム（500 ml）でゲル濾過を行い、ボイド容積付近に溶出する FVIII/vWF 複合体を回収した。

【0111】

続いて、このようにして得られた FVIII 活性を有するピーク回収液を 0.1 ミ

クロン メンブレンフィルター（ミリポア社製）で限外濾過することによって、回収液中に含まれる微量のフィブリノーゲンやフィブロネクチン等の不純物を除去した。

【0 1 1 2】

上記限外濾過操作を繰り返して約 1 0 万倍にまで濃縮した後、この濃縮液に 0 . 3 M 塩化カルシウムを添加することにより、FVIII/vWF複合体を解離した後、さらに上記と同様にして 0 . 1 ミクロン メンブレンフィルター（ミリポア社製）を用いて限外濾過することによって、FVIIIのみを選択的に膜を通過させ、純化FVIIIを得た。この際の純化FVIIIの比活性は 2 , 0 0 0 u / m g であり、回収率は約 4 0 % であった。

【0 1 1 3】

実施例 2

実施例 1 で得られたアンヒドロ X a カラムに B l o o d , 5 9 , 5 9 4 - 6 0 0 に記載の方法で精製したFVIII 約 5 0 0 0 単位を添加し、実施例 1 と同様の操作で溶出したところ約 8 5 % の回収率で 3 0 0 0 単位 / m g のFVIII が得られた。

【0 1 1 4】

【発明の効果】

本発明の新規物質では、アフィニティークロマトグラフィーによる特異的精製法を開発する上で、そのカギとなる F X a 基質および / または阻害剤との吸脱着が可能で安価なりガンドとして有用であり、F X a 基質および / または阻害剤の精製分野への有効利用が図れる。

【0 1 1 5】

本発明の新規物質の合成方法では、有用性のある新規物質を高収率に合成することができる。また、異種動物蛋白等の不純物の混入なく、安全に大量生産することもできる。

【0 1 1 6】

また、本発明の精製方法では、新規かつ安価な分離精製手段を利用し、簡単な分離精製操作および短い精製分離工数により、安価で高純度の F X a 基質および

／または阻害剤を効率よく安全かつ安定的に精製することができる。また、異種動物蛋白等の不純物の混入の危険性がなく、かつ安価にFVIIIを精製することもできる。また、肝炎（B型肝炎、C型肝炎）、AIDS（後天性免疫不全症候群）などのウイルス感染を伴うことなく、投与によっても血中のフィブリノーゲン濃度が過度に上昇するおそれのないFVIIIを精製することもできる。さらに、血漿中に少量しか含まれていないFVIIIを従来の精製方法に比べ高純度、高回収率に精製することができる。血漿以外の血小板や胎盤などの天然由来のFVIIIにより得られたFVIIIを従来の精製方法に比べ高純度、高回収率に精製し、さらに従来の精製方法で問題となっていた免疫原となるような不純物の含まれる可能性がほとんどなく、ウィルスの混入される確率が著しく減じて精製することができる。さらにまた、遺伝子組み換え操作により得られたFVIIIおよびその変異体（FVIIIのアミノ酸配列の少なくとも一のアミノ酸が遺伝子組換え操作により欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつFVIII活性を有する変異体）に対しても蛋白質等の不純物の分離精製を天然由来のFVIIIの精製方法を利用して行っている当該精製方法に比べ高純度、高回収率に精製することができる。すなわち、新規かつ安価な分離精製手段として、FXa基質および／または阻害剤と特異的かつ可逆的に反応するリガンドとして基質または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせたFXa、例えば、アンヒドロFXa等を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーを見出し、該アフィニティークロマトグラフィーの工程を設けることにより、FXa基質および阻害剤よりなる群から選ばれてなる1つのFXa基質および／または阻害剤の精製方法において、簡単な分離精製操作および短い精製分離工数により、例えば、抗FVIII抗体等を使用する製法に比して極めて安価で高収率（抗FVIII抗体による収率が30％程度と低いのに対し約2倍の60％程度と高収率である）で高純度のFXa基質および／または阻害剤を効率よく、異種動物蛋白等の不純物の混入の危険性がなく安全かつ安定的にFXa基質および／または阻害剤の所望の1つを精製することができるものである。

【0117】

本発明では、さらに、FXa基質および／または阻害剤以外の他の製剤等の精

製物の製造（特に、精製分離）時に、夾雑物として含有されている F X a 基質および／または阻害剤（2 種以上含まれていてもよい）を、F X a 基質および／または阻害剤と特異的かつ可逆的に反応するリガンドとして基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた F X a、例えば、アンヒドロ F X a 等を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーによる除去操作によって極めて効果的に取り除くことができるため、こうした製剤等の精製物の純度を高める手段にも適用することができ、幅広い製剤等の精製分離方法における極めて有効な F X a 基質および／または阻害剤の除去手段を提供することができる。

## 【0 1 1 8】

具体的には、本発明の FVIII の精製方法により、天然および遺伝子操作による FVIII のいずれであっても所期の目的である従来の精製方法に比べ高純度、高回収率に精製することができるほか、ヒトの胎盤由来の FVIII において問題とされる免疫原となりうる物質やウィルス効果を効果的に分離除去することができ、これらの混入の可能性を著しく軽減することができる。また、安全性に優れるヒトの血漿由来の FVIII においても、回収率および精製度のさらなる向上につながり貴重な血漿の有効利用につながる。

## 【0 1 1 9】

更に、本発明では、リガンドとして基質および阻害剤との結合に立体障害をおこさずに活性を失わせた F X a、例えば、アンヒドロ F X a 等を用いてなるアフィニティークロマトグラフィーを FVIII の精製工程に組み入れることにより、異種動物蛋白等の不純物の混入の危険性がなく、かつモノクローナル抗体等に比して安価に FVIII を精製することができる。



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アフィニティークロマトグラフィー用の親和性吸着体のリガンドとして、その有用性が認められる新規物質を提供する。

【解決手段】 基質および／または阻害剤との結合に立体障害を引き起こさずに求核性（活性）を失わせた活性化血液凝固第X因子およびこれに類似する物質。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000224101]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号

氏 名 藤森工業株式会社